Cryptogamie, Mycol. 1986, 7 (4) : 281-287

ÉVALUATION DE LA CONTAMINATION DES SEMENCES D'ORGE PAR *DRECHSLERA TERES* (SACC.) SHOEMAKER. MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE MÉTHODE DE DÉTECTION : «MÉTHODE DES CLOCHES»

par Zibo EL ID*

RÉSUMÉ. — Les méthodes de détection du *Drechslera teres* (Sacc.) Shoemaker (=*Helminthosporium teres* Sacc.) sur semences d'orge sont nombreuses. Elles présentent cependant un certain nombre d'inconvénients selon les techniques utilisées. Les défauts de ces techniques peuvent être corrigés au moins en partie, par la méthode dite «des cloches» qui favorise la mise en évidence du parasite.

SUMMARY. — There are many methods of detection of *Drechslera teres* (Sacc.) Shoemaker (= *Helminthosporium teres* Sacc.) on barley seeds. They do present, however, a number of drawbacks, depending on the techniques used. The defects of these techniques can be remedied, at least partly, by the method called «bells method», which allows a better detection of the parasite.

MOTS CLÉS : *Drechslera teres*, mycoflore, saprophytes, semences d'orge, méthodes.

INTRODUCTION

Drechslera teres (Sacc.) Shoemaker anamorphe de *Pyrenophora teres* Drechsl., agent d'une maladie foliaire de l'orge connue sous le terme de rayure réticulée (Net blotch), est présent dans toutes les régions tempérées et humides du monde (DICKSON, 1956).

Les semences contaminées constituent un moyen efficace de transmission et de conservation du pathogène dont la viabilité peut alors être supérieure à 10 ans (MACHACEK & WALLACE, 1952).

De ce fait l'analyse sanitaire des semences est une nécessité dans la stratégie de défense de la plante.

* Laboratoire de Pathologie végétale, E.N.S.A.I.A., 2 avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandœuvre-les-Nancy.

Afin d'assurer une meilleure mise en évidence du parasite sur les semences, nous avons effectué une recherche comparative mettant en œuvre les méthodes de détection classiques et celle que nous proposons.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

— Incubation des semences sur extrait de malt à 2 % gélosé à 2 %.

- Semences non désinfectées superficiellement : «Méthode d'Ulster» - MUSKETT & MALON (1941).
- Semences désinfectées superficiellement à l'hypochlorite de sodium : «Méthode Ulster modifiée» - MUSKETT & MALON (1956).
- Semences désinfectées à la chaleur : «Méthode Ulster modifiée - MALON (1962).

Les semences sont incubées à 20 ± 1°C pour une durée de 8 jours. A l'obscurité pour les premiers 5 jours, puis sous une photopériode de 12 h de lumière proche d'ultra violet (NUV), pour les trois derniers jours.

— Incubation des semences sur papier filtre humide.

- Méthode classique sur papier filtre humide - MUSKETT (1938).
- Méthode de congélation sur papier filtre humide - LIMONARD (1968).

Les conditions d'incubation utilisées sont :

- 10 jours à 20 ± 1°C sous une photopériode de 12 h (NUV) pour la méthode classique.

- 24 h à 20 ± 1°C à l'obscurité puis 24 h à −20°C et finalement 6 jours à 20 ± 1°C sous une photopériode de 12 h (NUV), pour la méthode de congélation.

— Méthode des cloches :

Les semences sont fixées sur des bandes de papier filtre stérile de 8 cm de longueur et de 2 cm de largeur (DURIEUX N° 111 sans cendre) avec la colle Limpidol à raison de 7 graines par bande à intervalle régulier. Ces graines sont maintenues sur le support par leurs côtés, donc sur une toute petite surface afin de ne pas empêcher leur contact avec le papier et l'absorption de l'eau. Les bandes sont ensuite fixées en rond sur 2 cercles à l'intérieur d'une cloche (Figure 1) et orientées de sorte que les zones embryonnaires se situent vers le bas. La cloche est ensuite déposée au-dessus d'une cuve en plastique contenant 700 ml d'eau à 60°C et l'ensemble est alors placé à 20°C. L'opération est renouvelée 2 fois toutes les 24 h et finalement une 3ème fois sur une nouvelle eau à 50°C pour la même durée, 24 h. Après ce traitement chaque bande, sortie de la cloche est déposée dans une boîte de Pétri stérile (boîte en verre de 9 cm de diamètre) contenant un disque de papier filtre stérile (DURIEUX N° 111 sans cendre) humidifié avec 2,5 ml d'eau distillée stérile. Les boîtes sont alors incubées à 20 ± 1°C pendant 7 jours sous une photopériode de 12 h de lumière proche d'ultra violet (NUV).

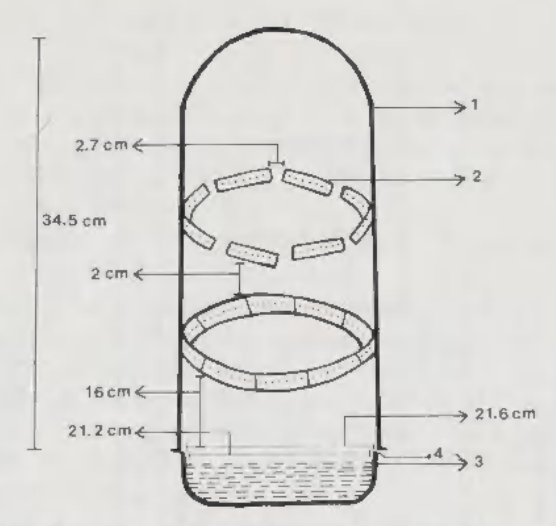


Fig. 1 — Principe de la méthode des cloches. 1. Cloche en verre de 34,5 cm de hauteur et de 21,6 cm de diamètre. 2. Bandes de papier filtre stériles de 8 cm de longueur et de 2 cm de largeur portant les semences /7 par bande/. Les 8 dans le premier cercle collées l'une à côté de l'autre. Les 6 dans le deuxième cercle collées à l'intervalle de 2,7 cm l'une de l'autre. Le premier cercle est placé dans la cloche à 16 cm de hauteur et le deuxième cercle à 2 cm au-dessus. 3. Cuve en plastique de 21,2 cm de diamètre contenant environ 700 ml d'eau. 4. Un espace minuscule résultant du diamètre non constant de la cloche.

Fig. 1 — Principle of the bells method. 1. Glass bell 34,5 cm high and with a diameter of 21,6 cm. 2. Pieces of sterile filter paper, 8 cm long and 2 cm wide, bearing the seeds /7 on each piece/. The 8 pieces in the first circle are glued one next to the other. The 6 pieces in the second circle are glued with intervals of 2,7 cm between each. The first circle is located 16 cm above the base of the bell, and the second circle 2 cm above the first. 3. Plastic vessel with a diameter of 21,2 cm, containing 700 ml water. 4. Small opening resulting from the non-constant diameter of the bell.

MODE D'OBSERVATION ET DE NOTATION DES RÉSULTATS

Pour les techniques d'incubation des semences sur milieu gélosé, l'observation des colonies du *Drechslera teres* est faite à l'œil nu.

Pour les techniques d'incubation des semences sur papier filtre humide, l'observation des conidiophores et des conidies du pathogène est faite à l'aide d'une loupe binoculaire.

Pour chaque variété d'orge et chaque technique 4 répétitions de 100 semences ont été utilisées.

Les résultats sont exprimés :

- en pourcentage des semences contaminées pour le *Drechslera teres* (moyenne sur 400 semences).
- en nombre total détecté sur 100 semences pour les autres champignons (moyenne sur 400 semences).

Tableau 1 — Pourcentages de contamination des semences de 4 variétés d'orge par *Drechslera teres*, obtenus par différentes méthodes. — Résultats calculés sur 400 semences pour chaque technique et chaque variété.

Table 1 — Percentages of contamination of the seeds of the 4 varieties of barley by *Drechslera teres*, obtained by different methods. — Results calculated on 400 seeds for each technique and each variety.

Méthodes	Ulster		Ulster modifiée "hypochlorite"		Ulster modifiée " chaleur "		Congélation sur papier filtre humide		Classique sur papier filtre humide		Des cloches	
Champignons / Variétés	*D. teres* .	Autres ..	*D. teres* .	Autres ..	*D. teres* .	Autres ..	*D. teres* .	Autres ..	*D. teres* .	Autres ..	*D. teres* .	Autres ..
" Castel "	6.2	117.6	10.5	82.8	8.2	73.4	12.0	123.0	17.0	123.0	23.7	155.6
" Gerbel "	12.5	128.8	32.7	103.3	32.2	120.0	28.8	132.1	42.2	137.8	76.2	162.5
" Monarque "	22.0	128.6	44.7	89.0	39.7	126.0	46.2	129.5	55.7	125.0	71.2	153.9
" Hop "	92.2	57.4	84.0	37.9	94.2	47.1	91.0	56.9	94.2	51.9	100	56.1

. en pourcentage (moyenne sur 400 semences)
. in percentage (average on 400 seeds)
.. principalement; *Epicoccum nigrum, Alternaria tenuis, Pullularia pullulans* et *Fusarium* spp., en nombre total sur 100 semences (moyenne sur 400 semences)
.. mainly; *Epicoccum nigrum, Alternaria tenuis, Pullularia pullulans* et *Fusarium* spp., in total number on 100 seeds (average on 400 seeds).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats du Tableau 1 nous permettent de constater que la mise en évidence du *Drechslera teres*, exprimé en pourcentage des semences contaminées, est influencée par la présence de nombreux champignons saprophytes existant essentiellement à la surface de la graine : *Epicoccum nigrum*, *Alternaria tenuis*, *Pullularia pullulans* et *Fusarium* spp.

L'effet antagoniste de ces saprophytes vis-à-vis du pathogène est lié à leur quantité et à la méthode de détection utilisée.

– Pour la variété d'orge «hop», la moins polluée en saprophytes, toutes les méthodes classiques ont fourni des résultats identiques quant au pourcentage de contamination par le parasite. Une exception est observée pour la technique d'Ulster modifiée où le désinfectant, hypochlorite de sodium, a éliminé une partie du *Drechslera teres*. Quant à notre méthode, elle a permis de mettre en évidence 100 % de contamination, maximum qui n'est jamais atteint par les méthodes habituelles.

– Pour les variétés «Castel», «Gerbel» et «Monarque», les plus contaminées en saprophytes, la mise en évidence du *Drechslera teres* par la méthode d'Ulster est considérablement gênée par le développement rapide de ces germes fongiques saprophytes.

En effet, plusieurs auteurs ont déjà montré le rôle inhibiteur des saprophytes sur le développement des champignons pathogènes. PONCHET (1966), en incubant sur milieu gélosé des microgouttes de mélange de spores en suspension de quatre espèces fongiques : *Alternaria tenuissima*, *Fusarium nivale*, *Septoria nodorum* et *Epicoccum nigrum*, a trouvé que ce dernier a dominé toutes les autres espèces dans les diverses combinaisons où il était associé. De même sur milieu gélosé, DIEM (1973) a observé que les spores de l'*Helminthosporium sativum* ne germent pas au contact d'une culture vivante d'*Aureobasidium pullulans* (*Pullularia pullulans*).

L'élimination d'une partie de ces germes fongiques saprophytes, surtout ceux de la surface, par les deux modifications de la méthode d'Ulster (hypochlorite ou chaleur) améliore les résultats obtenus. Cependant, leur présence n'est pas totalement supprimée, car parfois ils sont profondément localisés dans la graine (EL ID, 1984).

Grâce à une pression moins importante des saprophytes et une meilleure sporulation du *Drechslera teres* dans la méthode de LIMONARD (congélation) le pourcentage détecté de contamination par le pathogène est très nettement supérieur à celui obtenu par la technique d'Ulster.

Par rapport à la méthode habituelle d'incubation des semences sur papier filtre humide, la congélation, en tuant les semences, provoque un développement plus rapide des saprophytes et bien qu'en fin d'incubation leur nombre soit sensiblement identique pour les 2 méthodes, la mise en évidence du *Drechslera teres* devient moins facile.

Dans la méthode classique sur papier filtre, le manque d'humidité dû au soulèvement des semences par les racines défavorise l'apparition du parasite.

La méthode des cloches corrige ces inconvénients en maintenant les semences au contact du papier filtre humide pendant toute la période d'incubation: ceci conduit au développement beaucoup plus important du parasite et à une observation plus facile et plus rapide.

En effet, dans cette méthode, la vapeur d'eau, saturant l'atmosphère, humidifie la surface de la graine et le papier. L'absorption de l'eau par les semences s'effectue donc sur toute la surface de la graine, et peut être maintenue grâce à un contact permanent avec le papier filtre humide.

CONCLUSION

Les pourcentages de semences contaminées par *Drechslera teres* obtenus par la méthode des cloches sont beaucoup plus importants que ceux obtenus par les méthodes classiques. Ceci est surtout dû aux conditions d'incubation des semences dans la nouvelle technique qui favorise :

- une sporulation importante du parasite grâce à une absorption permanente de l'eau par les semences,
- une pression peu importante des champignons saprophytes sur le pathogène grâce à la germination des semences,
- une observation rapide et facile du pathogène grâce au contact permanent des semences avec le papier filtre.

Cette nouvelle méthode peut également être utilisée pour mettre en évidence le *Drechslera graminea (= Helminthosporium gramineum)* sur des semences d'orge. Légèrement modifiée elle donne des résultats très satisfaisants pour *Fusarium roseum* var. *culmorum* et *graminearum* et *Septoria nodorum* sur semences de blé; *Phoma valerianellae* sur semences de mâche.

Des améliorations sont envisageables afin de permettre une meilleure standardisation de la technique, mais il n'en reste pas moins que l'élément décisif du succès reste la bonne répartition et l'absence de variations de l'humidité au niveau de la spermosphère.

BIBLIOGRAPHIE

DICKSON J.G., 1956 — *Diseases of field crops.* New York, Mc Graw Hill Book Co. Inc., Ed. 2, 517 p.

DIEM H.G., 1973 — Recherches sur la phyllosphère de l'orge. Thèse Doctorat d'État, Université de Nancy I, 140 p.

EL ID Z., 1984 — Nouvelles méthodes de détection de l'*Helminthosporium teres* Sacc. sur semences d'orge, mise au point et application. Thèse Docteur Ingénieur I.N.P.L. E.N.S.A.I.A., Nancy, 85 p.

LIMONARD T., 1968 — Ecological aspects of seed health testing. *Proc. Int. Seed Testing*

Assoc. 33 : 343-513.

MACHACEK J.E. and WALLACE H.A.H., 1952 – Longevity of some common fungi in cereal seed. *Canad. J. Bot.* 30 : 164-169.

MALON J.P., 1962 – Studies on seed health IV. The application of heat to seed oat as an aid in the detecting of *Pyrenophora avenae* by the Ulster method. *Proc. Int. Seed Testing Assoc.* 27 : 856-861.

MUSKETT A.E., 1938 – Biological technique for the evaluation of fongicide. I. The evaluation of seed desinfectants for the control of *Helminthosporium* disease of oats. *Ann. Bot. (London)* 2 : 699-715.

MUSKETT A.E. and MALON J.P., 1941 – The Ulster method for the examination of flax seed for the presence of seed borne parasites. *Ann. Appl. Biol.* 28 : 8-13.

MUSKETT A.E. and MALON J.P., 1956 – Detection of seed borne parasites in seed. *Nature (London)* 177 : 465-466.

PONCHET J., 1966 – Étude des communautés micropéricarpiques du caryopse de blé. *Ann. Epiphyt.* 17 (mem. hors série n° 1) : 112 p.